

0- 785324

на правах рукописи

ЗУБЦОВА Жанна Исаковна

**АНАЛИЗ ДЕВЯТИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ОНКОМАРКЕРОВ НА
ГИДРОГЕЛЕВОМ БИОЧИПЕ**

03.01.03 – Молекулярная биология

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук**

Москва

2010

Работа выполнена в Лаборатории биологических микрочипов Учреждения Российской академии наук Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН и на кафедре молекулярной биофизики МФТИ (ГУ)

Научный руководитель:

кандидат химических наук
А. Ю. Рубина

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук
Г. Т. Гурия,
доктор физико-математических наук
Ю. П. Лысов

Ведущая организация:

Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения

Защита диссертации состоится 9.12. 2010 г. в 11⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.235.01 при Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН по адресу 119991 г. Москва, В-334, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН

Автореферат разослан 3 ноября 2010 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук


А.М. Крицын

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000681150

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФП – альфа-фетопротеин
 БСА – бычий сывороточный альбумин
 ДЦР – доля достоверно положительных результатов
 ДОР – доля достоверно отрицательных результатов
 ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
 ИФА – иммуноферментный анализ
 НСЕ – нейрон-специфическая енолаза
 ПСА – простат-специфический антиген
 ПСАсвоб - свободная форма простат-специфического антигена
 ПСАобщ - общая форма простат-специфического антигена
 РЭА – раково-эмбриональный антиген
 СА 125 – опухоли-ассоциированный антиген 125
 СА 15-3 – опухоли-ассоциированный антиген 15-3
 СА 19-9 – опухоли-ассоциированный антиген 19-9
 Су3 – флуоресцентный краситель цианиновый третий
 Су5 – флуоресцентный краситель цианиновый пятый
 ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.

Биологические микрочипы (биочипы), представляющие собой массивы ячеек, содержащих иммобилизованные биологические зонды (ДНК, РНК, олигонуклеотиды, белки, пептиды, олигосахариды, клетки и т.д.), были созданы для проведения многопараметрического анализа образцов. Иммобилизация зондов производится либо непосредственно на поверхности носителя, такого как стекло, пластик, металл, и др., либо в объеме трехмерных гелевых ячеек, закрепленных на подложке. В ИМБ РАН разработана одна из технологий изготовления трехмерных гидрогелевых микрочипов.

Одним из перспективных направлений исследований является разработка на основе технологии трехмерных гидрогелевых микрочипов метода одновременного количественного определения в сыворотке крови человека различных биологических параметров, например, таких, как уровень маркеров онкологических заболеваний (онкомаркеров). Онкомаркеры используются в клинической практике для подтверждения диагноза и мониторинга проводимой терапии. Одновременное определение нескольких онкомаркеров увеличивает возможности дифференциальной диагностики заболеваний. Выявление повышенной концентрации только одного онкомаркера не является доказательством для постановки диагноза онкопатологии.

логии, поскольку может быть связано с наличием у обследуемого человека воспалительного процесса. Анализируя только один онкомаркер у обследуемого пациента, можно пропустить повышение концентрации какого-либо из онкомаркеров, выявление которого может поменять сам диагноз. Для определения локализации опухоли также важно знать не только значения концентраций отдельных маркеров, но и их соотношения.

В Лаборатории биологических микрочипов ИМБ РАН разработан метод одновременного количественного иммунофлуоресцентного анализа нескольких антигенов на биочипе. В данной работе представлена разработка прототипа тест-системы, предназначенной для одновременного количественного определения девяти серологических онкомаркеров методом иммунофлуоресцентного анализа на биочипе. Определение концентрации нескольких онкомаркеров традиционными иммуноферментными тест-системами, предназначенными для анализа только одного онкомаркера, работа трудоемкая и требует затраты большого количества ресурсов. Этим недостатком лишена многопараметрическая тест-система на основе биочипа.

Для оценки диагностических возможностей разработанной тест-системы была определена достоверность определения концентраций девяти онкомаркеров в сыворотках крови пациентов и здоровых доноров в сравнении с общепризнанными и широко используемыми в клинической практике иммунохимическими тест-системами и проведено сравнение получаемых данных.

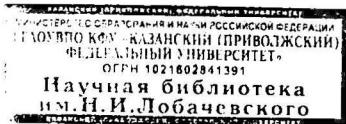
Для проведения клинической диагностики важно определять концентрации онкомаркеров с высокой чувствительностью. Нами была исследована возможность улучшения аналитических характеристик разработанного прототипа тест-системы за счет использования подложек для биочипов с зеркальным металлическим покрытием.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Целью диссертационной работы является разработка прототипа тест-системы для одновременного количественного анализа девяти маркеров онкологических заболеваний в сыворотке крови человека на гидрогелевом биочипе, и оптимизация метода с использованием подложек с зеркальным металлическим напылением.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Создать биологический микрочип, содержащий массив гелевых элементов с иммобилизованными антителами против девяти онкомаркеров.
2. Разработать протокол проведения одновременного количественного иммуноанализа девяти онкомаркеров в сыворотке крови на биочипе.



3. Определить аналитические характеристики разработанного прототипа тест-системы.
4. Провести сравнение результатов одновременного определения девяти онкомаркеров в сыворотке крови на биочипе с результатами, полученными при индивидуальном определении концентрации каждого из онкомаркеров с применением традиционно используемых иммуноферментных тест-систем.
5. Провести статистическую обработку полученных результатов одновременного количественного иммуноанализа онкомаркеров в сыворотках крови онкологических больных и доноров.
6. Изучить возможности оптимизации иммуноанализа онкомаркеров на биочипе при применении зеркальных подложек:
 - 6.1. Исследовать физические факторы, влияющие на эффект усиления флуоресценции на гидрогелевых биочипах, изготовленных на подложках с зеркальным металлическим покрытием.
 - 6.2. Оценить чувствительность одновременного количественного иммуноанализа онкомаркеров на биочипе при использовании подложек с зеркальным покрытием.
 - 6.3. Оценить возможность сокращения времени иммуноанализа при использовании подложек с металлизированной поверхностью.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

В рамках данной работы был впервые разработан прототип тест-системы для одновременного количественного анализа девяти маркеров онкологических заболеваний, часто применяемых в диагностике онкологических заболеваний. Был создан биочип, являющийся основной частью тест-системы и содержащий иммобилизованные антитела против девяти анализируемых онкомаркеров: альфа-фетопротейна (АФП), раково-эмбрионального антигена (РЭА), хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), опухоли-ассоциированного антигена 15-3 (СА 15-3), 125 (СА 125), 19-9 (СА 19-9), общей и свободной форм простат-специфического антигена (ПСАобщ и ПСАсвоб), нейрон-специфической енолазы (НСЕ), и разработан протокол проведения одновременного количественного иммуноанализа девяти онкомаркеров.

В данной работе было впервые проведено исследование эффекта усиления флуоресцентного сигнала для трехмерных гидрогелевых микрочипов, нанесенных на подложку с зеркальным металлическим покрытием, и продемонстрирована возможность увеличения чувствительности иммунофлуоресцентного анализа. Были выявлены факторы, влияющие на данный эффект, и показало, что в отличие от микрочипов с иммобилизованными непосред-

венно на металлизированной поверхности зондами, для которых усиление флуоресценции обусловлено, в основном, плазмонным механизмом*, эффект усиления сигнала флуоресценции на гелевых микрочипах можно объяснить, не выходя за рамки геометрической оптики.

Разработанный метод анализа онкомаркеров был протестирован на 500 сыворотках крови больных и здоровых доноров. Была проведена статистическая обработка полученных данных и показано, что результаты одновременного определения концентраций девяти онкомаркеров в сыворотке крови человека на биочипе коррелируют с результатами, полученными при индивидуальном определении концентрации каждого из онкомаркеров с использованием стандартных коммерческих иммуноферментных тест-систем, с доказанной диагностической достоверностью определения.

Исходя из полученных результатов анализа сывороток пациентов с установленными другими методами диагнозами на биочипе, были определены диагностическая специфичность и чувствительность разработанного метода, а также были определены прогностическая значимость положительных и отрицательных результатов. Разработанный прототип тест-системы может быть использован для проведения первичной диагностики заболеваний (скрининга) и мониторинга хода лечения.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.

Результаты работы докладывались на 51-й Научной конференции МФТИ (27-30 ноября, 2008, Москва), были представлены на Итоговых конференциях по результатам выполнения мероприятий за 2008 и 2009 годы в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (8-10 декабря, 2008, Москва, 25-27 ноября, 2009, Москва), на 2-ой Окружной научно-технической конференции молодых ученых и специалистов (4 февраля, 2010, Зеленоград), на 9-ой Международной научно-практической конференции "Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности" (22-23 апреля, 2010, Санкт-Петербург).

ПУБЛИКАЦИИ.

По результатам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из которых 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАКа, одна заявка на получение патента и 6 тезисов.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.

Диссертация состоит из введения, трех глав (литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение), выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на

* Joseph R. Lakowicz, «Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission», Analytical Biochemistry 337 (2005) 171–194

114 страницах машинописного текста, содержит 23 рисунков и 8 таблиц. Библиография включает 24 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Биологические микрочипы (биочипы)

Биочипы – массивы ячеек, содержащих различные молекулярные зонды – в отличие от общепризнанных методов позволяют проводить многопараметрический анализ образцов. В данной работе были использованы трехмерные гидрогелевые биочипы, изготовленные по технологии, разработанной в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН под руководством академика А. Д. Мирзабекова*. В основе технологии изготовления гидрогелевых биочипов лежит метод фотоиндуцируемой сополимеризации. Технология универсальна и позволяет изготавливать биочипы, содержащие различные по своей природе иммобилизованные зонды: ДНК, РНК, белки, сахараиды и пр. После завершения процесса полимеризации каждый иммобилизованный молекулярный зонд ковалентно закреплен в полимерной сетке геля и равномерно распределен в объеме гелевой ячейки биочипа. Число гелевых ячеек и их расположение на подложке может варьировать и зависеть от задач и условий планируемого эксперимента.

В данном исследовании были разработаны микрочипы с иммобилизованными белками, для которых нами был подобран такой состав полимеризационной смеси, который обеспечивает достаточную для диффузии исследуемых белков пористость геля и позволяет проводить иммунологические реакции с образованием различных комплексов на микрочипе. В процессе изготовления биочипа после завершения полимеризации и отмывки избытка гелеобразующих мономеров осуществлялась обработка биочипа блокировочным раствором, уменьшающим неспецифическое связывание, в результате чего биочип оказывался полностью подготовленным к проведению анализа.

2. Биочип для одновременного количественного анализа девяти онкомаркеров

В качестве объектов были выбраны следующие серологические маркеры: АФП, РЭА, ХГЧ, СА 15-3, СА 125, СА 19-9, ПСАобщ, ПСАсвоб, НСЕ (Таблица 1). Для проведения «сэндвич»-анализа для каждого маркера была выбрана такая пара моноклональных антител, которая не обладает перекрестным взаимодействием с другими антителами, используемыми в анализе, не взаимодействует с другими определяемыми онкомаркерами, обладают максимальным отношением величины каждого значимого сигнала к нулевому, а также дают наиболее выраженный рост на участке калибровочной кривой. На основании выбранных пар моноклональных антител были сконструирован биочип и создана проявляющая система

* Мирзабеков А.Д., Рубина А.Ю., Паньков С.В. (2003) Способ полимеризационной иммобилизации биологических макромолекул и композиция для его осуществления. Патент РФ N 2216547. Бюл. изобр. № 32

флуоресцентно окрашенных антител для количественного иммуноанализа девяти маркеров онкологических заболеваний. Структура биочипа приведена на рисунке 1.

Таблица 1. Онкомаркеры, анализируемые на гидрогелевых биочипах.

Онкомаркер, принятое сокращение	Концентрация в крови в норме	Повышается при:
Альфа-фетопротеин (АФП)	≤ 10 нг/мл (у мужчин и небеременных женщин)	Гепатокарцинома, тератома, беременность
Раково-эмбриональный антиген (РЭА)	≤ 5 нг/мл < 10 нг/мл (для курильщиков)	Аденокарциномы кишечника, легких, молочной железы, С-клеточная карцинома щитовидной железы
Хорионический гонадотропин (ХГЧ)	≤ 10 МЕ [*] /л (у мужчин и небеременных женщин)	Рак легких, органов мочеполовой системы и желудочно-кишечного тракта, органов репродуктивной системы, хорионэпителиома, хорионкарцинома, карцинома яичка и плаценты, тератомы яичника и яичек
Раковый антиген 15-3 (СА 15-3)	≤ 28 МЕ/мл (у небеременных женщин)	Карцинома молочной железы, легких
Раковый антиген 125 (СА 125)	≤ 35 МЕ/мл	Рак яичников, сопутствующий маркер многих опухолей
Раковый антиген 19-9 (СА 19-9)	≤ 37 МЕ/мл	Карцинома поджелудочной железы, кишечника, желудка, желчекаменные болезни, панкреатит
Простата-специфический антиген Общая форма (ПСА-общ) Свободная форма (ПСАсвоб)	≤ 4 нг/мл (мужчины до 50 лет) ПСА _{своб} /ПСА _{общ} > 0.15	Рак простаты
Нейрон-специфическая енолаза (НСЕ)	≤ 12.5 нг/мл	Мелкоклеточный рак легких, опухоли нейроэндокринного происхождения

*концентрация в Международных Единицах активности

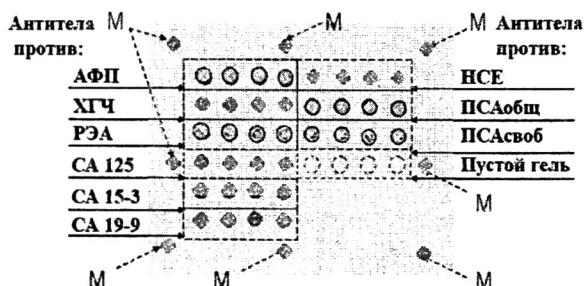


Рис. 1. Биочип для проведения одновременного количественного иммуноанализа девяти онкомаркеров (АФП, ХГЧ, РЭА, СА125, СА15-3, СА19-9, НСЕ, ПСАобщ, ПСАсвоб). Флуоресцентное изображение после иммуноанализа. Биочип содержит гелевые элементы, диаметром 120 мкм и объемом 0,1 нл (по четыре одинаковых элемента в ряду) с иммобилизованными моноклональными антителами против девяти онкомаркеров и контрольные ячейки, не со-

держат биоматериал (пустые гелевые элементы, положение которых показано пунктирными кругами). По краям биочипа расположены маркерные гелевые ячейки (М) с иммобилизованным красителем цианиновым пятым (Cy5).

2.1. Процедура одновременного количественного анализа девяти онкомаркеров

Для одновременного количественного определения содержания онкомаркеров в образце был выбран двухстадийный «сэндвич»-иммуноанализ с флуоресцентной регистрацией сигнала: биочипы инкубировали на первой стадии реакционным раствором, содержащим анализируемый образец (или калибровочную пробу), на второй стадии инкубировали со смесью флуоресцентно меченых антител против исследуемых антигенов. После отмывки от непрореагировавших компонентов производили регистрацию флуоресцентных сигналов. Расчет интенсивности флуоресцентного сигнала от каждой ячейки биочипа проводили с помощью программного обеспечения ImageAssay (ИМБ РАН). Вычисление интенсивности флуоресценции каждого гелевого элемента биочипа производили следующим образом: изображение каждой ячейки окружалось концентрической окружностью. Флуоресцентный сигнал F определялся согласно формуле (1):

$$F = \frac{I_m - B_{d.c.}}{B_{r.g.} - B_{d.c.}}, \quad (1)$$

где I_m – медианный флуоресцентный сигнал, рассчитанный для ячейки микрочипа. Для того, чтобы учесть пространственную неоднородность интенсивности источника излучения, биочип заменяли красным стеклом с такими же геометрическими размерами. Получали фоновый сигнал от участков, соответствующих участкам изображения внутри концентрических окружностей ($B_{r.g.}$). Для учета шумов микроскопа флуоресцентный и фоновый сигналы корректировали шумовым сигналом $B_{d.c.}$, измеренным при нулевой интенсивности источника.

При анализе полученных данных интенсивность флуоресценции рассчитывали как медианный сигнал от четырех одинаковых гелевых ячеек.

Для количественного определения концентрации антигена методом иммуноанализа на биочипе необходимо получить график зависимости флуоресцентного сигнала гелевых элементов, содержащих иммобилизованные антитела, от концентрации соответствующего антигена в калибровочной пробе (калибровочную кривую). Для упрощения процедуры анализа были разработаны калибровочные пробы, содержащие одновременно все девять анализируемых онкомаркеров (АФП, ХГЧ, РЭА, СА 125, СА 15-3, СА 19-9, НСЕ, ПСАобщ, ПСАсвоб) в диапазонах концентраций, необходимых для проведения клинического анализа. Нулевая калибровочная проба не содержала онкомаркеров. В качестве проявляющих антител использовали смесь антител против всех девяти онкомаркеров, и, таким образом, при постановке анализа получали одновременно девять калибровочных кривых. Калибровочные кривые строи-

лись с использованием кусочно-линейной интерполяции. Концентрацию каждого онкомаркера в сыворотке крови определяли по соответствующей ему калибровочной кривой.

Для того, чтобы правильно определить концентрацию онкомаркера в сыворотке крови, важно избежать так называемого эффекта матрикса, когда на результат анализа влияет окружение, в котором находится анализируемое вещество. Необходимо, чтобы анализируемое вещество в образце взаимодействовало с иммобилизованными на биочипе и флуоресцентно-меченными антителами в тех же условиях, что и в калибровочных пробах, поэтому калибровочные пробы для анализа девяти онкомаркеров изготавливали на основе пулированной сыворотки крови здоровых доноров. При необходимости анализа сывороток с высокими концентрациями онкомаркеров для их разведения использовали нулевую калибровочную пробу.

2.2. Количественный анализ девяти онкомаркеров на биочипах

Для оценки воспроизводимости и аналитической чувствительности анализа была проведена серия экспериментов на семидесяти биочипах (по десять калибровочных кривых для одновременного анализа каждого из девяти онкомаркеров). Калибровочные кривые для определения онкомаркеров, полученные на биочипах, показаны на рисунке 2.

Для повышения достоверности данных анализа в состав биочипа включали четыре одинаковые гелевые ячейки для каждого иммобилизованного белка, при этом рассчитывали интенсивность флуоресценции как медианный сигнал по четырем ячейкам. Биочипы, у которых отклонения от среднего значения диаметра ячеек превышали 5%-е отклонение внутри биочипа и 8%-е отклонение между биочипами, отбраковывали. Простая методика постановки анализа и автоматический подсчет результатов анализа позволили уменьшить вероятность мануальных ошибок. Коэффициент вариации для различных концентраций определяемых антигенов не превышал 15%.

Известно, что одной из основных характеристик количественного анализа является чувствительность. Аналитическую чувствительность характеризует наименьшая определяемая концентрация, которую для каждого онкомаркера рассчитывали как концентрацию, соответствующую интенсивности флуоресценции, превышающей на два стандартных отклонения флуоресцентный сигнал многократно измеренной (десять раз) нулевой калибровочной пробы. Полученные значения аналитической чувствительности на биочипах были ниже значений нормы, определенной в индивидуальном анализе для каждого из онкомаркеров (Таблица 2), что дало основания рассматривать разработанный прототип тест-системы перспективным для клинического применения.

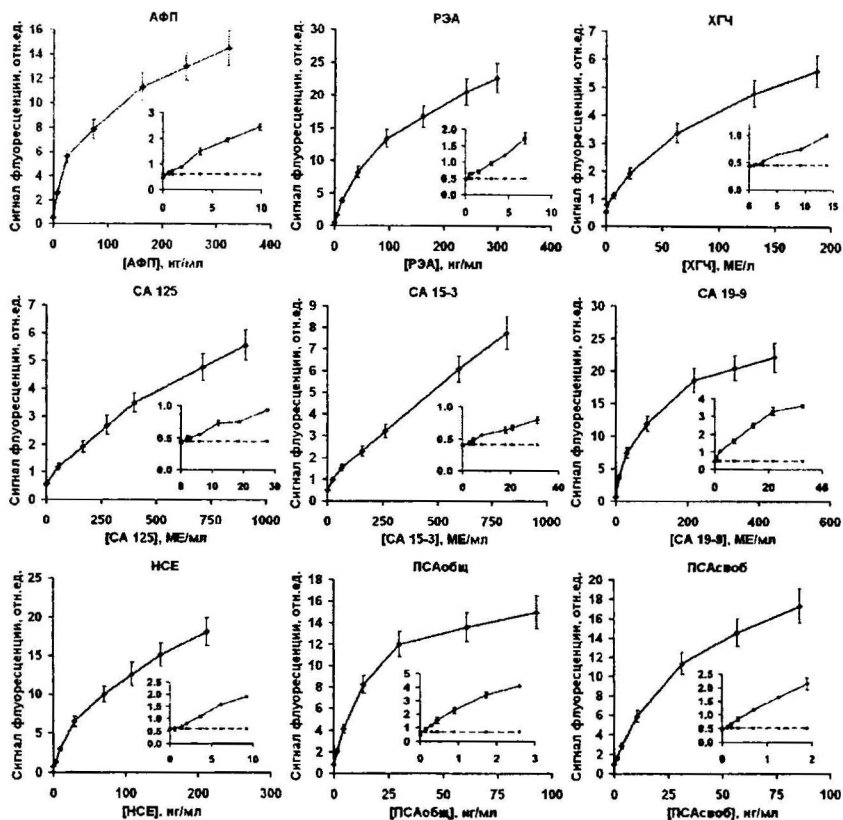


Рис.2. «Сэндвич»-иммуноанализ АФП, РЭА, ХГЧ, СА 125, СА 15-3, СА 19-9, НСЕ, ПСАобщ и ПСАсвоб. Графики зависимости интенсивности флуоресцентного сигнала гелевых элементов, содержащих иммобилизованные антитела, от концентрации соответствующего антигена в калибровочной пробе (калибровочные кривые). Каждая точка калибровочной кривой – среднее значение из измерений, полученных на десяти биочипах. На вставках приведены начальные участки соответствующих кривых с дополнительной раститровкой калибровочных проб, используемые для определения аналитической чувствительности анализа каждого онкомаркера.

3. Определение содержания девяти онкомаркеров в сыворотках крови

Разработанный метод количественного анализа девяти онкомаркеров в сыворотке крови был апробирован на образцах более 500 сывороток крови больных онкологическими заболеваниями и здоровых доноров. Результаты исследований сопоставляли с таковыми, полученными традиционными методами ИФА («CanAg») («Fujirebio») (Швеция), DSL (США) для

ХГЧ) Результаты сравнительного определения девяти онкомаркеров двумя методами приведены на рисунке 3.

Таблица 2. Аналитическая чувствительность анализа онкомаркеров на гидрогелевых биочипах на прозрачной и металлизированной подложках и в стандартных тест-системах.

Онко-маркер	Концентрация в крови в норме	Биочипы на прозрачной подложке	Биочипы на металлизированной подложке	Коммерческие тест-системы CapAg и DSL
АФП	≤ 10 нг/мл (у мужчин и небеременных женщин)	0,7	0,2	0,5
ХГЧ	≤ 10 МЕ/л (у мужчин и небеременных женщин)	2,0	0,7	0,8
РЭА	≤ 5 нг/мл < 10 нг/мл (для курящих)	0,7	0,2	0,5
СА125	≤ 28 МЕ/мл (у небеременных женщин)	1,7	0,4	1,5
СА15-3	≤ 35 МЕ/мл	7,0	1,7	1,0
СА19-9	≤ 37 МЕ/мл	0,4	0,1	1,0
ПСАобщ ПСАсвоб	≤ 4 нг/мл (мужчины до 50 лет)	0,3	0,1	0,1
	$\frac{\text{ПСА}_{\text{своб}}}{\text{ПСА}_{\text{общ}}} > 0.15$	0,2	0,05	0,03
НСЕ	≤ 12.5 нг/мл	1,3	0,4	1,0

* Коэффициент вариации при определении концентраций не превышал 15%.

Данные тестирования онкомаркеров с помощью стандартных тест-систем, принятые в качестве референсных значений, позволяют рассчитать для каждого онкомаркера долю достоверно положительных результатов (ДПР) и достоверно отрицательных результатов (ДОР), полученных на биочипе относительно стандартных тест-систем без учета пограничных значений концентраций каждого из онкомаркеров, находящихся близко к значению нормы. Значения пограничных зон концентраций для всех онкомаркеров были взяты из литературных источников*.

Показатели ДПР и ДОР рассчитывали по следующей схеме (Таблица 3): рассмотрим четырехпольную таблицу сопряженности, которая строится на основе результатов классифика-

* В.П. Земляной, Т.Н. Трофимова, С.Л. Непомнящая, Т.В. Дементьева. Современные методы диагностики и оценки степени распространенности рака ободочной и прямой кишки. Практическая онкология. Т.6, № 2 (2005) 71-80

ции концентраций онкомаркеров, измеренных на биочипах, и концентраций онкомаркеров в этих же сыворотках, измеренных в ИФА тест-системах (CanAg (Швеция)).

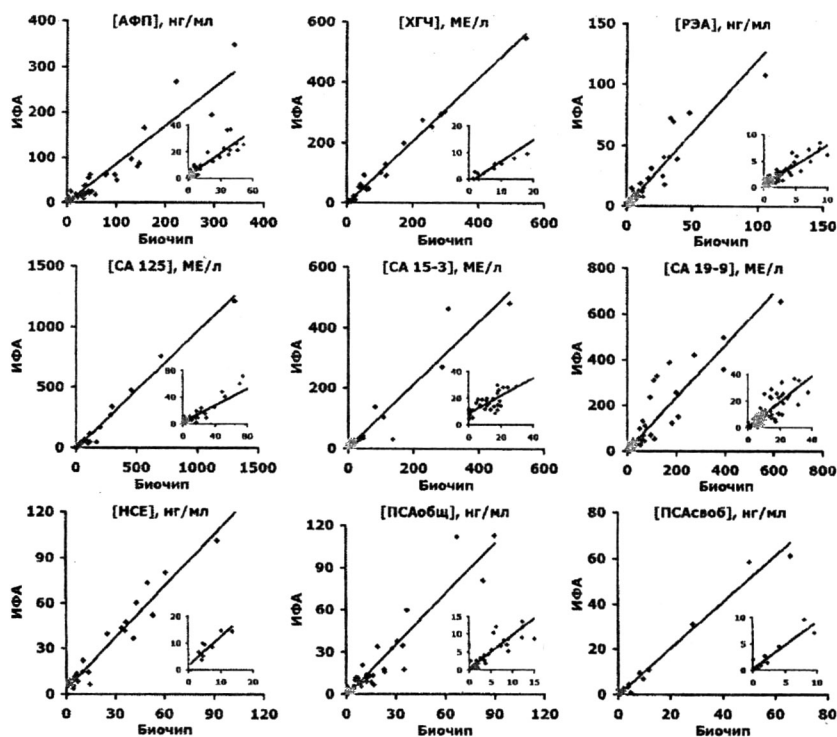


Рис. 3. Результат корреляционного анализа концентраций девяти онкомаркеров (АФП, ХГЧ, РЭА, СА125, СА15-3, СА19-9, ПСАобщ, ПСАсвоб, НСЕ). Концентрации были получены после проведения одновременного количественного сэндвич-иммуноанализа девяти онкомаркеров на биочипе и в индивидуальном анализе с использованием традиционных тест-систем. Проведенные прямые соответствуют наилучшей линейной аппроксимации.

Таблица 3. Принцип расчета сопряженности полученных результатов на биочипах и стандартных тест-системах

		Стандартные тест-системы	
		Выше нормы	Ниже нормы
Биочип	Выше нормы	П	ЛП
	Ниже нормы	ЛО	О

Обозначения:

- П - верно классифицированные положительные примеры, то есть значения концентраций онкомаркеров в сыворотках в обоих случаях были выше нормы (так называемые истинно положительные случаи);
- О - верно классифицированные отрицательные примеры, то есть значения концентраций онкомаркеров в сыворотках в обоих случаях были ниже нормы (истинно отрицательные случаи);
- ЛО - положительные примеры, ложно классифицированные как отрицательные, то есть на чипе значения измеренных концентраций онкомаркеров были ниже нормы, а на стандартных тест-системах они были выше нормы;
- ЛП - отрицательные примеры, ложно классифицированные как положительные, то есть на чипе значения измеренных концентраций онкомаркеров были выше нормы, а на стандартных тест-системах они были ниже нормы.

Доля достоверно положительных случаев:

$$ДПР = \frac{П}{П + ЛО} \cdot 100\% \quad (2)$$

Доля достоверно отрицательных случаев, которые были правильно идентифицированы на чипах:

$$ДОР = \frac{О}{О + ЛП} \cdot 100\% \quad (3)$$

Результаты корреляционного анализа, значения ДПР, ДОР и пограничные значения для каждого онкомаркера представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты корреляционного анализа онкомаркеров на биочипе.

Онкомаркер	Коэффициент корреляции Биочип / ИФА	Количество измерений	Пограничные значения	ДПР, %	ДОР, %
АФП	0,91	130	5-10 нг/мл	92,3	100
ХГЧ	0,99	41	5-10 МЕ/л	92	70
РЭА	0,95	341	5-10 нг/мл	100	99,2
СА 125	0,97	125	30-40 МЕ/мл	100	87,5
СА 15-3	0,84	98	22-30 МЕ/мл	76,2	92,6
СА 19-9	0,87	236	30-40 МЕ/мл	74,1	96,4
НСЕ	0,97	26	10-12,5 нг/мл	92,9	61,5
ПСАобщ	0,95	120	4-10 нг/мл	100	100
ПСАсвоб	0,86	37	15-20%	75	100

Для всех измерений $p < 0,01$, где p – уровень значимости, величина которого дополняет доверительную вероятность до единицы: $p = 1 - P_{\text{дов}}$ (Н. Джонсон, Ф. Лион Статистика и планирование эксперимента в технике и науке. Методы обработки данных. М.: Мир, 1980).

Как видно из рисунка 3 и таблицы 4, результаты одновременного определения девяти онкомаркеров в сыворотке крови человека на биочипе хорошо коррелируют с результатами,

полученными при индивидуальном определении концентрации каждого из онкомаркеров с использованием общепризнанных по качеству коммерческих ИФА тест-систем (CanAg (Швеция)).

4. Группировка онкомаркеров в соответствии с диагнозами

Анализируемые сыворотки обследуемых пациентов с известными диагнозами (569 лиц) были рассортированы по основным группам согласно международной классификации болезней (МКБ-10). Для каждой из групп сывороток были определены достоверные значения превышения нормы концентраций онкомаркеров, как для индивидуальных антигенов, так и комбинаций из нескольких онкомаркеров. В таблице 5 представлены данные количественного анализа девяти онкомаркеров в сыворотках крови, сгруппированные в соответствии с диагнозами: онкологические заболевания, неонкологические заболевания и здоровые доноры. В исследуемых сыворотках фиксировали превышение нормы концентрации любого из девяти онкомаркеров, поскольку у здорового человека уровень каждого из определяемых маркеров должен быть ниже верхней границы нормы.

Если оценивать результативность данной тест-системы с точки зрения возможности скрининга для выявления не только онкологических заболеваний, то на основе таблицы 4, а также формул (2) и (3) и сгруппировав все имеющиеся результаты анализов на биочипах в соответствии с диагнозами больной/здоров (Таблица 6), можно вычислить чувствительность и специфичность разработанного теста. Чувствительность теста ($Чв$) в данном случае определялась как доля лиц с концентрацией хотя бы одного из девяти онкомаркеров, превышающей значение нормы, от общего числа лиц, имеющих заболевания (1), и оказалась равной $Чв=73,7\%$, специфичность ($Сп$) – доля лиц с отрицательным результатом теста среди здоровых (2) и соответствовала значению $Сп=94,1\%$. Исходя из полученных значений, можно сделать вывод, что разработанный прототип тест-системы можно использовать для проведения первичной диагностики заболеваний (скрининг населения).

Таблица 5. Данные количественного анализа девяти онкомаркеров в сыворотках крови пациентов и здоровых доноров

Группа	Общее количество сывороток в группе	Количество сывороток с концентрацией хотя бы одного онкомаркера выше нормы	Количество сывороток с концентрацией хотя бы одного онкомаркера выше нормы, %
Онкологические больные	252	193	76,6%
Неонкологические больные	132	90	68,2%
Здоровые доноры	185	11	6,0%

Таблица 6. Взаимоотношения между результатами теста и наличием или отсутствием заболевания

Биочип	Обследуемые		
		больной	здоровый
		П=193+90=283	ЛП=11
Выше нормы		ЛО=252+132-193-90=101	О=185-11=174
Ниже нормы			

Другой важной характеристикой тест-системы является ее прогностическая значимость. Прогностическая значимость положительного результата — это вероятность заболевания при положительном результате теста: $\frac{Ч_в}{Ч_в + (100 - Ч_н)} \cdot 100\% = 92,6\%$. Прогностическая значимость отрицательного результата — это вероятность отсутствия заболевания при отрицательном результате теста: $\frac{Ч_н}{Ч_н + (100 - Ч_в)} \cdot 100\% = 78,2\%$. Не очень высокое значение последнего результата по сравнению с традиционными ИФА тест-системами означает, что для установления диагноза «здоров» необходимо дополнительное обследование.

На рисунке 4 представлено распределение сывороток с повышенным (выше нормы) содержанием онкомаркеров по группам для заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). В первом случае (А) были выбраны сыворотки больных со злокачественными новообразованиями органов пищеварения. Во вторую группу (Б) были включены сыворотки больных с диагнозами язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, неинфекционный энтерит и колит, болезни желчного пузыря, желчевыводящих путей и поджелудочной железы и другие болезни органов пищеварения.

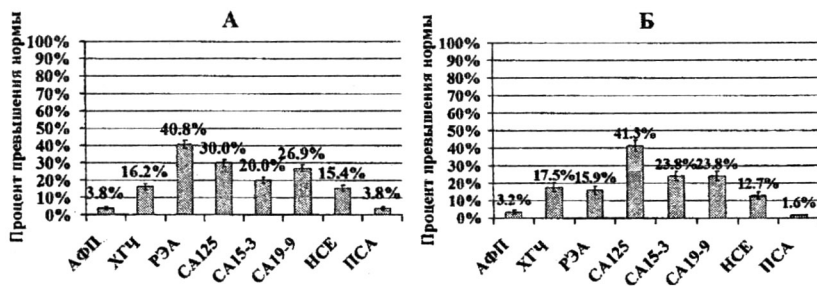


Рис. 4. Профили частоты встречаемости значений концентраций онкомаркеров, превышающих верхнюю границу нормы для заболеваний желудочно-кишечного тракта. А – группа со

злокачественными новообразованиями органов пищеварения, всего 130 сывороток, Б – группа с неонкологическими заболеваниями органов пищеварения, всего 63 сыворотки. Погрешность измерений считалась по формуле погрешности для биномиального распределения $\sigma = \sqrt{p(1-p)/n}$, где p – доля сывороток с концентрацией онкомаркера выше нормы, n – количество сывороток в группе.

При сравнении профилей частоты встречаемости значений, превышающих норму для онкопатологий ЖКТ и доброкачественных заболеваний, видно, что для злокачественных новообразований органов пищеварения наиболее характерно повышение онкомаркеров РЭА (40,8%), СА 125 (30,0%) и СА19-9 (26,9%). Для неонкологических заболеваний ЖКТ наиболее часто наблюдается повышенные значения СА125. Из литературных данных известно, что повышение концентраций онкомаркеров РЭА и СА 19-9, наиболее часто происходит при злокачественных заболеваниях желудочно-кишечного тракта. С другой стороны, при неонкологических заболеваниях часто наблюдают повышенные значения СА125, что подтверждается полученными нами результатами. Также известно, что СА125 обладает наименьшей специфичностью к типу патологии, поэтому у здоровых людей значение его концентрации не превышает верхней границы нормы.

При увеличении выборки данных для статистического анализа, мы рассчитываем выявить комбинации онкомаркеров, характерных для других онкопатологий.

5. Микрочипы на металлизированных подложках

Было замечено, что использование подложек с металлическим покрытием значительно улучшает отношение сигнал/фон, определяющее чувствительность анализа*. Увеличение времени экспозиции приводит к увеличению сигналов, как от ячеек, так и от подложки микрочипа, тогда как отношение сигнал/фон остается неизменным при разных временах экспозиции. В наших экспериментах фоновые сигналы на чипах с прозрачной и металлизированной подложках были одинаковы.

Для проведения экспериментов по оценке усиления интенсивности флуоресценции на зеркальных подложках было изготовлено несколько серий биочипов, в каждой из которых гелевые ячейки, содержащие гелеобразующие мономеры и молекулярные зонды одинакового состава, были нанесены на прозрачные стеклянные и на зеркальные металлизированные подложки. Все эксперименты были трижды повторены в одинаковых условиях. Относительная погрешность в экспериментальных данных не превышала 15%. Данные, приведенные ниже, соответствуют медианному значению сигналов по четырем ячейкам с одинаковой концентрацией иммобилизованных зондов.

Выявление факторов, определяющих усиление сигнала

5.1. Природа иммобилизованного зонда

* H. Metiu. Surface enhanced spectroscopy. Prof. Surface Sci. 17 (1984) 153–320.

Для выявления зависимости усиления сигнала от природы исследуемого объекта проводили оценку усиления флуоресценции для гелевых микрочипов с металлизированными подложками по сравнению с гелевыми микрочипами на прозрачном стекле. В ячейках микрочипа были иммобилизованы флуоресцентно-меченный белок (бычий сывороточный альбумин-Су5) и олигонуклеотид (5'-АААТАТ-3'-Су5). Также сравнивали в аналогичных условиях сигналы, получаемые для различных типов иммунокомплексов, образующихся в результате иммуноанализа на биочипе (двойного, тройного и комплекса из 4 компонент). Во всех случаях на металлизированных микрочипах получали ~4-5-и кратное усиление сигнала флуоресценции.

5.2. Тип красителя

Была исследована зависимость эффекта усиления сигнала от типа красителя. Были исследованы два флуоресцентных красителя Су3 и Су5 (длины волн возбуждения/эмиссии, 550/570 нм и 650/670 нм, соответственно). Оказалось, что усиление флуоресцентных сигналов для микрочипов, изготовленных на подложках с зеркальной поверхностью, практически одинаково (Таблица 6).

Таблица 6. Усиление сигналов в разных условиях.

Краситель	Сухие ячейки	Набухшие ячейки	Под буфером
Су5	4,0 ÷ 5,0	8,0 ÷ 10,0	2,0 ÷ 3,0
Су3	4,5 ÷ 5,0	9,0 ÷ 10,0	2,3 ÷ 3,0

5.3. Концентрация флуорофора

Для того чтобы оценить возможную нелинейность зависимости величины флуоресцентных сигналов от концентрации иммобилизованных зондов, мы использовали микрочипы с иммобилизованным в различных концентрациях флуоресцентно-меченным белком БСА-Су5. Соотношение числа молекул красителя на молекулу зонда для БСА-Су5 составило 4:1. Наблюдалась линейная зависимость величины флуоресцентного сигнала от концентрации красителя, при этом усиление сигнала флуоресценции от количества красителя не зависело. Отметим, что линейность наблюдалась в области, в которой величины сигналов превышают значение сигнала от наименьшей достоверно определяемой концентрации иммобилизованного зонда. Ее рассчитывали как величину, соответствующую интенсивности флуоресценции, превышающей на два стандартных отклонения многократно (более 10 раз) измеренный сигнал от ячейки, не содержащей иммобилизованного красителя. Экстраполяция линейной зависимости сигналов флуоресценции в сторону высоких значений концентраций зондов в гелевых элементах будет справедлива вплоть до $\sim 10^{-4} - 10^{-3}$ М, при которых межмолекулярные расстояния между зондами становятся сравнимыми с их размерами. В наших услови-

ях количество красителя были ниже значения $\sim 10^{-5}$ М, которое соответствует межмолекулярному расстоянию ~ 100 нм. Таким образом, в используемом диапазоне концентраций флуорофора наблюдается линейная зависимость сигналов флуоресценции от количества красителя, и коэффициент усиления флуоресцентных сигналов не зависит от концентрации флуорофора. На основании проведенных исследований в работе делаем вывод, что это справедливо для всех типов комплексов.

5.4. Влияние формы ячейки

При исследовании эффекта усиления сигнала для микрочипов, изготовленных на металлизированной подложке, по сравнению с микрочипами, нанесенными на прозрачное стекло, нами было обнаружено, что после процедуры отмывки и высушивания эффект усиления существенно снижается с 8-10 кратного для ячеек, насыщенных глицерином, до 4-5-кратного для сухих чипов. Мы предположили, что одним из факторов, влияющих на различие в усилении флуоресцентного сигнала, является форма гелевой ячейки, которая существенно меняется при высушивании (см. рис. 5А и 5В).

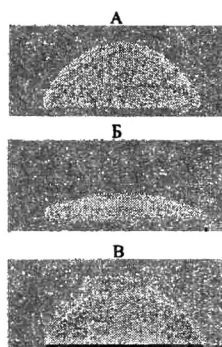


Рис. 5. Фотографии гелевых ячеек микрочипа, полученные при помощи конфокального микроскопа, на стеклянной поверхности: (А) восстановленная водным раствором глицерина гелевая ячейка (высота ячейки составляет ~ 50 мкм); (Б) гелевая ячейка после отмывки и высушивания (высота ~ 25 мкм); и (В) набухшая гелевая ячейка, полученная после помещения высушенной ячейки под буферный раствор (высота ~ 50 мкм). Радиусы ячеек составляют приблизительно 60 мкм.

В результате исследований, проведенных на конфокальном микроскопе, были определены параметры гелевых ячеек микрочипа для различных состояний. Высота гелевых ячеек на стеклянных и металлизированных подложках после отмывки и высушивания составляла 25 ± 3 мкм, радиусы – 60 ± 2 мкм. Форма набухшей гелевой ячейки, полученная после помещения микрочипа под слой жидкости, соответствует форме ячейки после нанесения и полимеризации (см. рис. 5А и 5В). При добавлении водного раствора глицерина на сухой микрочип, гелевые элементы также приобретают набухшую полусферическую форму (рис. 5В). После удаления избытка раствора глицерина с поверхности гелевого элемента наблюдается усиление флуоресценции 8-10 раз по отношению к аналогичным ячейкам на стеклянной поверхности (ср. рис. 5А).

В рамках исследования было проведено сравнение усиления сигналов от ячеек плоской формы с относительным усилением сигналов от слоя геля с поперечными размерами $0,8\text{см} \times 1,2\text{см}$ и толщиной 30 мкм, содержащим краситель Су5 в тех же концентрациях, что и в гелевых ячейках биочипа. Было получено четырехкратное усиление сигнала флуоресценции на зеркальной поверхности как для слоя геля с флуорофором, так и для высушенной гелевой ячейки с иммобилизованным флуорофором.

5.5. Влияние слоя жидкости

Рисунок 6 иллюстрирует влияние слоя жидкости на сигналы флуоресценции на микрочипах с иммобилизованным флуоресцентно-меченым БСА-Су5. Эксперименты проводили с использованием деионизированной воды. Чипы находились под пластиковыми камерами с внутренним объемом 25 мкл.

Слой воды, покрывающий ячейки, снижает коэффициент усиления с 4-5 до ~2-2,5 раз.

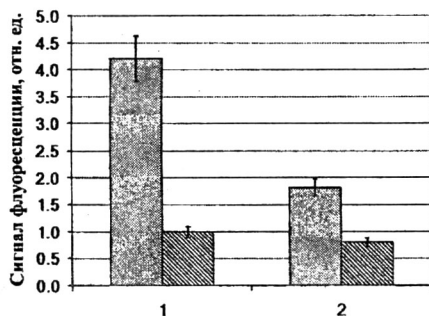


Рис. 6. Влияние слоя жидкости на сигналы флуоресценции для гидрогелевого микрочипа с иммобилизованным флуоресцентно-меченым БСА: 1 – сухой микрочип без слоя воды; и 2 – микрочипы под слоем воды в камере высотой 250 мкм. Для каждой пары столбцов в диаграмме левые столбцы соответствуют сигналам от микрочипов на зеркальной подложке, а правые – на прозрачной подложке.

5.6. Механизм усиления флуоресцентных сигналов

Все наблюдаемые нами эффекты поддаются объяснению в рамках геометрической оптики (рис. 7). Пористый гель ячеек всегда содержит некоторое количество воды (белковые молекулы не теряют своей активности^{*}), поэтому гелевые ячейки являются «гладкими» для длин волн 550 и 650 нм.

Очевидно, что зеркальная поверхность с высокой отражательной способностью усиливает возбуждающий свет на флуорофоре по сравнению с прозрачной подложкой (в два раза при 100% отражении) (см. также рис. 7Аа). Отражение флуоресцентного излучения от металлической поверхности дополнительно усиливает также в два раза регистрируемый сигнал

^{*} Rubina A.Yu., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Darii E.L., Pan'kov S.V., Barsky V.E., Ivanov S.M., Konovalova E.V., A.D. Mirzabekov. Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *BioTechniques*. 34 (2003) 1008-1022.

(рис. 7Аб). Вместе это приводит к четырехкратному усилению флуоресцентного сигнала, наблюдаемому для гелевых ячеек плоской формы.

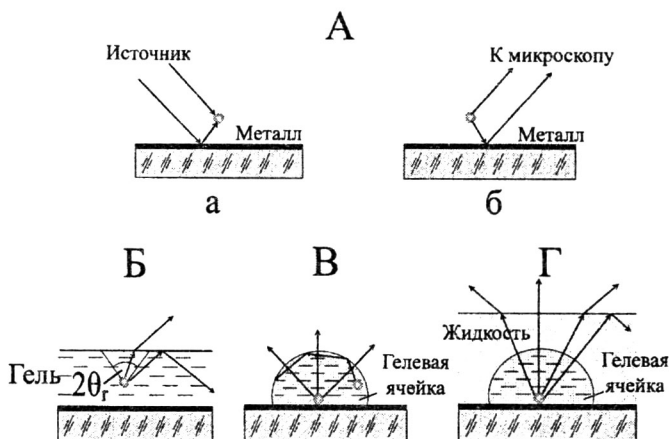


Рис. 7. Эффекты, объясняемые в рамках геометрической оптики, ответственные за усиление флуоресценции на гидрогелевых микрочипах с зеркальными подложками. А – отражение излучения возбуждения от зеркальной подложки приводит к эффективному двукратному усилению возбуждающего облучения флуорофора (а). Флуоресцентный микроскоп регистрирует как прямое, так и отраженное излучение, испущенное флуорофором (б). Б – выход излучения от флуорофора в слое геля. Лучи с углами падения $\theta < \theta_c$ ($\sin \theta_c = 1/n_{\text{gel}}$, где n_{gel} – показатель преломления для геля) выходят из слоя геля и могут регистрироваться флуоресцентным микроскопом, в то время как лучи с углами падения $\theta > \theta_c$ полностью отразятся назад от внешней границы геля и уйдут сквозь прозрачную подложку, или рассеются к боковым торцам слоя геля в случае зеркальной подложки. В – выход излучения от флуорофора внутри полусферической ячейки. Г – выход излучения от флуорофора внутри полусферической ячейки под слоем жидкости.

Эффекты внутреннего отражения от внешних границ гелевой ячейки и выход отраженного излучения из ячейки могут объяснить зависимость усиления от формы ячейки и присутствия слоя жидкости над гелевыми ячейками (в последнем случае отражение от внешней границы буферного раствора также должно быть принято во внимание) (рис. 7Б-7Г). В третьей главе диссертационной работы (Результаты и их обсуждение) приведены оценки выхода излучения для плоской и полусферической гелевых ячеек. При значениях показателя преломления геля $n_{\text{gel}} = 1,47^*$ часть излучения флуоресценции в плоской гелевой ячейке отразится обратно в результате полного внутреннего отражения и при этом либо уйдет через прозрачную поверхность подложки (если нет напыления), либо отразится от металлического слоя (если напыление присутствует) и после переотражений уйдет в боковые торцы ячейки

* Ching-Yu Lin, Hui-Ming Huang, and Han-Min Chen. Use of backlit light plate to enhance visualization of imidazole-zinc reverse stained gels. *BioTechniques* 41 (2006) 560-564, p. 564

(рис. 7Б). Результирующее усиление сигнала флуоресценции в плоской гелевой ячейке равно 4-5. В сторону приемного устройства из полусферической ячейки выходит излучения примерно в два раза больше, чем из плоской ячейки. На металлизированной поверхности дополнительное усиление по сравнению с аналогичными ячейками на стекле указывает на выход из полусферической ячейки мод полного внутреннего отражения (рис. 7В). Эта часть излучения была бы потеряна при излучении флуоресценции из полусферических гелевых ячеек на прозрачной подложке. Интегральное усиление флуоресценции для полусферических ячеек на металлизированной подложке по сравнению с полусферическими ячейками на прозрачной поверхности достигало ~8-10 раз.

При наличии слоя жидкости полное внутреннее отражение излучения от внешней границы слоя жидкости над ячейкой микрочипа будет примерно таким же, как от границы плоской гелевой ячейки при отсутствии слоя жидкости (рис. 7Б и 7Г). Поэтому усиление излучения от полусферической ячейки под слоем жидкости не может превышать соответствующего усиления (~ 4), получаемого от ячеек с плоской формой. Вследствие оптических потерь на границе гелевая ячейка-жидкость и, соответственно, менее эффективного возбуждения флуорофора в ячейке усиление излучения ячейки, находящейся под слоем жидкости, уменьшается до значения ~ 2-3.

6. Оптимизация иммуноанализа на микрочипах с металлическим напылением

Для оценки влияния эффекта усиления флуоресцентных сигналов на чувствительность анализа были получены калибровочные кривые сэндвич-иммуноанализа онкомаркеров на биочипах, изготовленных на стеклянных подложках и стеклянных подложках с золотым напылением фирмы Nunc, США.

Как видно из рисунка 8А (на примере калибровочных кривых для общей формы ПСА), при равных условиях проведения анализа, в том числе равном времени инкубации, получено 4-5-кратное усиление флуоресцентных сигналов на металлизированных подложках для всех концентраций антигенов. В точке с нулевой концентрацией антигена усиления флуоресцентных сигналов не наблюдали, так как, благодаря правильному подбору пар антител, не дающих неспецифического связывания, интенсивность флуоресценции от флуорофора, находящегося в гелевой ячейке с иммобилизованными антителами при нулевой концентрации антигена (по сути, сигнал неспецифического взаимодействия), находится за пределами чувствительности прибора.

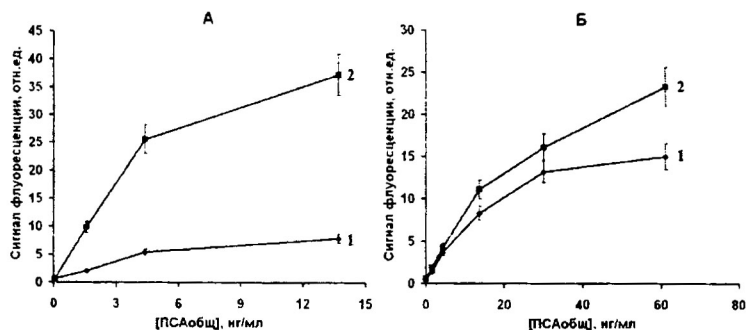


Рис. 8. Калибровочные кривые для сэндвич-иммуноанализа общей формы ПСА на гидрогелевых биочипах, изготовленных на стеклянной (1) и зеркальной (2) подложках:

А – начальный участок кривых, в обоих случаях время инкубации составляло 20 часов;

Б – на стеклянной подложке (1), время инкубации составляло 20 часов, на зеркальной подложке (2) – 3 часа.

Чем больше значение сигнала флуоресценции от заданной концентрации на калибровочной кривой, то есть чем больше угол наклона калибровочной кривой на начальном участке, тем выше точность анализа, что мы и видим из рисунка 8А и из данных таблицы 2.

Из приведенных данных видно, что чувствительность, получаемая в одновременном анализе девяти онкомаркеров на биочипах с металлизированными подложками выше, чем чувствительность, получаемая в индивидуальном анализе девяти онкомаркеров с помощью традиционных коммерческих иммуноферментных тест-систем, и эта чувствительность удовлетворяет требованиям клиницистов, дальнейшее ее повышение нецелесообразно.

Другая возможность оптимизации анализа при использовании эффекта усиления флуоресценции на биочипах с металлизированными подложками состоит в сокращении времени анализа. Для биочипов, изготовленных на стеклянной подложке, нами было подобрано время инкубации 20 ч, исходя из уровней сигналов, обеспечивающих необходимую чувствительность анализа онкомаркеров. При инкубации образца в течение трех часов для большинства онкомаркеров чувствительность анализа на чипах на металлизированной подложке изменилась незначительно (рис. 8Б).

Таким образом, применение металлизированных подложек при изготовлении микрочипов позволяет оптимизировать два основных параметра иммуноанализа: повысить чувствительность и/или уменьшить время анализа.

ВЫВОДЫ

1. Разработан прототип тест-системы для одновременного количественного определения девяти онкомаркеров: альфа-фетопротеина, раково-эмбрионального антигена, хорионического гонадотропина человека, раковых антигенов CA 125, CA 15-3, CA 19-9, двух форм простат-специфического антигена (ПСАобщ и ПСАсвоб), нейрон-специфической енолазы на биочипе. Установлены основные аналитические характеристики метода.
2. Показано, что результаты одновременного определения девяти онкомаркеров в сыворотке крови на биочипе коррелируют с результатами, полученными при индивидуальном определении концентрации каждого из онкомаркеров с использованием стандартных иммуноферментных тест-систем.
3. Проведена статистическая обработка результатов одновременного количественного иммуноанализа девяти онкомаркеров в сыворотках крови. Определены чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительных и отрицательных результатов разработанного прототипа тест-системы.
4. Изучены факторы, влияющие на эффект усиления флуоресценции на гидрогелевых микрочипах. Основываясь на результатах наших исследований, эффект усиления флуоресценции на гидрогелевых микрочипах с металлическим напылением мы можем объяснить, не выходя за рамки геометрической оптики. Показано, что использование подложек с зеркальным напылением позволяет оптимизировать процедуру иммуноанализа.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Ж. И. Зубцова**, М. А. Филиппова, Е. Н. Саватеева, Д. А. Зубцов, В. Р. Четкин, Е. В. Гришин, А. С. Заседателев, А. Ю. Рубина. Усиление сигнала флуоресценции на гелевых биочипах с зеркальной поверхностью и оптимизация процедуры иммуноанализа. Доклады Академии Наук, т. 427, №1, 2009, с. 118-121.
2. **Zubtsova Zh.I**, Zubtsov D.A., Savvateeva E.N., Stomakhin A.A., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S., Rubina A.Y. Hydrogel-based protein and oligonucleotide microchips on metal-coated surfaces: Enhancement of fluorescence and optimization of immunoassay. Journal of Biotechnology, v. 144, 2009, p. 151-159.
3. **Зубцова Ж. И.**, Савватеева Е. Н., Зубцов Д. А., Поплетаева С. Б., Юрасов Р. А., Цыбульская М. В., Рубина А. Ю. Разработка многопараметрической тест-системы для диагностики онкологических заболеваний женской репродуктивной системы. Труды МФТИ, Том 2, № 2 (6) 2010, с. 16-22.

Патентная заявка

1. **Ж.И. Зубцова**, Е.Н. Савватеева, А.А. Стомахин, М.В. Цыбульская, А.Ю. Рубина. Многопараметрическая диагностическая тест-система для обнаружения и мониторинга терапии рака молочной железы и рака яичников. Заявка №2009139323, дата приоритета от 27.10.2009.

Тезисы

1. **Зубцова Ж. И.** Исследование природы усиления сигнала флуоресценции на гидрогелевых биочипах с зеркальной поверхностью. 51 Научная Конференция МФТИ Россия, Москва 2008.
2. **Ж. Зубцова**, Е. Савватеева, М. Филиппова, М. Цыбульская, А. Рубина. Биологический микрочип для одновременного количественного анализа маркеров онкологических заболеваний. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2008 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». ИМБ РАН, Россия, Москва, 2008.
3. **Зубцова Ж.И.**, Цыбульская М.В., Савватеева Е.Н., Филиппова М.А., Зубцов Д.А., Юрасов Р.А., Стомахин А.А., Рубина А.Ю. Биологический микрочип для одновременного количественного анализа маркеров онкологических заболеваний. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». ИМБ РАН, Россия, Москва, 2009.
4. **Ж.И. Зубцова**, Е.Н. Савватеева, М.А. Филиппова, М.В. Цыбульская, А.Ю. Рубина. Одновременный анализ девяти серологических онкомаркеров на биологическом микрочипе. Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии. ИБХ РАН, Россия, Москва, 2009.
5. **Зубцова Ж. И.**, Зубцов Д. А., Стомахин А. А., Рубина А. Ю. Разработка метода изготовления подложек с контролируемой степенью гидрофобности для формирования гидрогелевых биочипов. 2-я Окружная научно-техническая конференция молодых ученых и специалистов. НП "Центр развития предпринимательства Зеленоградского административного округа города Москвы", Россия, Зеленоград, 2010.
6. **Зубцова Ж.И.**, Поплетаетва С.Б., Савватеева Е.Н., Бутвиловская В.И., Цыбульская М. В., Рубина А. Ю. Онкодиагностический биочип для одновременного количественного анализа девяти белковых онкомаркеров и определения уровня аутоантител к онкоассоциированным сахаридам в сыворотке крови человека. 9-я Международная научно-практическая конференция "Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности", Россия, Санкт-Петербург, 2010.

Подписано в печать: 25.10.2010

Заказ № 4361 Тираж - 100 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru

